



Ana P. Martínez<sup>1\*</sup>, Sixta T. Martínez<sup>1</sup>, Harold D. Ardila<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Grupo de Investigación Estudio de Actividades Metabólicas Vegetales, Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá. Bogotá, Colombia. Cra. 30 #45-03, edificio 451. Tel: 3165000. Código postal: 111321.

\*Autor para correspondencia: apmartinezg@unal.edu.co

Recibido: 13 de Octubre de 2016. Aceptado: 14 de Febrero de 2017.

## Condiciones para el análisis electroforético de proteínas apoplásticas de tallos y raíces de clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) para estudios proteómicos

### Resumen

En el presente estudio se describe un flujo de trabajo que puede ser aplicado a diferentes especies vegetales, con el fin de obtener extractos apoplásticos que puedan ser usados para análisis proteómicos. Para ello, usando tallos y raíces de clavel, se evaluaron parámetros claves para la extracción de estas proteínas. Se determinó que para esta especie (*Dianthus caryophyllus* L.) se debe usar la solución amortiguadora fosfato de sodio 0,1 M pH 6,5, cloruro de sodio 50 mM y 0,1%  $\beta$ -mercaptoetanol para la infiltración; con tres tiempos de vacío de 20 s a 70 kPa y centrifugación a 1000 x g durante 20 min a 4 °C, seguido de precipitación y concentración de proteínas con el método Ácido tricloroacético/acetona. Bajo estas condiciones, se obtienen extractos que permiten análisis electroforéticos en 2D de proteínas de apoplasto, usando para el isoelectroenfoco tiras con gradientes de pH 5-8 para raíz y pH 3-10 para tallo. Las condiciones descritas permitirán profundizar sobre el papel de las proteínas apoplásticas en diversidad de fenómenos biológicos que involucren esta especie vegetal.

**Palabras clave:** fluido apoplástico, *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*, planta-patógeno, electroforesis.

## Electrophoretic conditions for analysis of apoplastic proteins in stems and roots of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) for proteomic studies

### Abstract

In the present study a workflow, that can be applied to different plant species, to obtain a high quality apoplastic extract and for proteomic analysis is described. For that, using carnation roots and stems, some important parameters for the extraction of these proteins were evaluated. The best conditions for the infiltration were provided by using a 0.1 M sodium phosphate buffer pH 6.5, 50 mM sodium chloride and  $\beta$ -mercaptoethanol 0.1%, with 3 vacuum times at 70 kPa for 20 s and centrifuged at 4°C at 1,000 g for 20 min, and then a subsequent protein precipitation and concentration with the Trichloroacetic acid/acetone protocol. These conditions can be used to obtain a good quality extract for 2D electrophoretic analysis of apoplastic proteins. Strips with pH gradients between 5-8 and 3-10 were used to run isoelectric analysis for extracts obtained from apoplast in roots and stems, respectively. The conditions described can be used to perform studies focused on apoplastic proteins and its role in biological phenomena involving this plant species.

**Keywords:** apoplastic fluid, *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*, plant-pathogen, electrophoresis.

## Condições para a análise eletroforética de proteínas apoplásticas de caules e raízes de cravo (*Dianthus caryophyllus* L.) para estudos proteômicos

### Resumo

No presente estudo, é descrito um fluxo de trabalho que pode ser aplicado a espécies vegetais diferentes, para obter extratos apoplásticos que podem ser utilizados para análise proteômica. Para isto, utilizando os caules e as raízes do cravo, foram avaliados parâmetros considerados chave para a extração destas proteínas. Foi determinado que para esta espécie, deve ser utilizada uma solução tampão de fosfato de sódio 0,1 M pH 6,5 com cloreto de sódio 50 mM e 0,1%  $\beta$ -mercaptoetanol para a infiltração; com três aplicações de vácuo de 20 s a 70 kPa e centrifugação a 1000 x g por 20 minutos a 4°C, e subsequente precipitação e concentração de proteínas usando Ácido tricloroacético/acetona. Nestas condições se podem obter extratos que permitem a análise eletroforética 2D de proteínas do apoplasto utilizando para a focalização isoeletrica tiras com gradientes de pH 5-8 para a raiz e de pH 3-10 para o caule. As condições descritas permitirão aprofundar sobre o papel das proteínas apoplásticas numa diversidade de fenómenos biológicos que envolvem esta espécie de planta.

**Palavras-Chave:** Fluido apoplástico, *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*, patógeno de planta, eletroforese.

## Introducción

El apoplasto de la planta, compuesto por la matriz de la pared celular y los espacios intercelulares, juega un papel importante en una amplia gama de procesos fisiológicos: interacción celular, transporte de agua y nutrientes, interacciones planta-patógeno, percepción y transducción de señales ambientales, entre otros (1, 2). La llegada de los fitopatógenos al apoplasto vegetal es una fase crítica en la mayoría de las enfermedades infecciosas, pues es donde se presentan los primeros eventos que determinan la susceptibilidad o la resistencia (1). Durante la activación de los mecanismos de defensa de las plantas, se requiere la regulación de una amplia variedad de proteínas que están implicadas en el fortalecimiento de la pared celular y en diversos niveles de la percepción y degradación de patógenos. La regulación fina de dichas proteínas presentes en el apoplasto de la planta es esencial para una rápida y efectiva percepción del patógeno, lo que conduce a mantener la integridad de la pared celular de la planta (3-5).

Sin embargo, aunque es evidente la importancia del proteoma apoplástico durante una interacción planta-patógeno dada, este permanece pobremente caracterizado en comparación con el proteoma intracelular. Esto se debe especialmente a la dificultad para obtener suficiente fluido apoplástico, sin romper la membrana celular y sin la contaminación con proteínas citoplasmáticas (1). Considerando que los estudios sobre el cambio dinámico de la composición de proteínas del apoplasto han generado nuevo conocimiento acerca de la respuesta de las plantas al estrés biótico (3, 6), se requiere de protocolos adecuados para la extracción del fluido apoplástico en aquellas especies vegetales que son abordadas por primera vez en este tipo de estudios.

Lo anterior es aún más determinante cuando se pretende aplicar técnicas de separación de proteínas altamente resolutivas, basadas en aproximaciones holísticas propias de los estudios proteómicos, en donde la contaminación con proteínas citoplasmáticas puede generar confusión durante la interpretación de resultados. Durante este tipo de análisis, se debe evitar la contaminación con componentes no proteicos que puedan interferir con las técnicas de separación e identificación de proteínas como electroforesis bidimensional en gel (2 DE) con posterior análisis por espectrometría de masas (MS) o cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS). La técnica más empleada para la extracción del fluido apoplástico está basada en la combinación de tres factores: i) vacío, ii) infiltración y iii) centrifugación. Este método posee dos pasos decisivos: la infiltración con vacío, donde se emplea una solución apropiada, y la centrifugación (7-9).

Debido a que la solubilidad de las proteínas depende de diversos factores como la temperatura, la constante dieléctrica del medio, el pH, la fuerza iónica y la presencia de agentes reductores, diferentes soluciones de infiltración han sido utilizadas para la obtención de fluido apoplástico en diversas especies vegetales, entre las que se encuentran agua (10), ácido ascórbico 20 mM/CaCl<sub>2</sub> 20 mM (11), sorbitol 100 mM (12), solución amortiguadora Tris-HCl 25 mM, pH 8,0 (13), solución amortiguadora fosfato de sodio 100 mM (14), NaCl 50 mM (15) o solución amortiguadora Tris-HCl 50 mM pH 8,0 NaCl 3,5% p/v y β-mercaptoetanol 0,1% v/v (5). En el presente estudio se evaluaron parámetros como pH (empleando Tris-HCl pH 8,0 y Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 6,5), fuerza iónica (NaCl 0,5 mM y 0,6 M), así como el efecto de la adición de un agente reductor como el β-mercaptoetanol.

En cuanto a la velocidad de centrifugación, se ha determinado que, empleando hojas de diversas especies de plantas, un incremento en la fuerza de centrifugación puede conducir a la contaminación con proteínas citoplasmáticas. De acuerdo a dichos estudios se determina que si la fuerza de centrifugación no excede las 1000 g, la contaminación citoplasmática es despreciable (8).

Los análisis de proteínas apoplásticas son dispendiosos teniendo en cuenta la baja concentración de proteínas que se presentan en los fluidos obtenidos bajo las técnicas reportadas (1, 4, 15). Es por ello que se hace necesario usar diferentes técnicas de precipitación que además de concentrar las proteínas, permiten la eliminación de interferentes que pueden afectar la separación electroforética posterior. Para ello se han reportados diferentes métodos que incluyen la precipitación usando diferentes solventes y soluciones salinas (4, 15-19). Sin embargo, dependiendo de la naturaleza de la matriz vegetal a estudiar, estos pueden causar pérdida de proteína debido a la cantidad de pasos experimentales implicados o a la pérdida de solubilidad en la fase final de disolución. Es por ello que se deben evaluar las condiciones más convenientes teniendo en cuenta la matriz vegetal objeto de estudio.

Los análisis comparativos de proteínas usando técnicas altamente resolutivas se han convertido en una de las herramientas más importantes durante los análisis proteómicos en plantas. Dentro de estas se incluyen la técnica de electroforesis en dos dimensiones (2DE), la cual ha permitido el estudio de proteínas apoplásticas en diferentes especies vegetales (1, 4, 5, 15, 20, 21). Es por ello que, con el fin de determinar algunas de las condiciones más relevantes que se deben tener en cuenta para el análisis mediante esta técnica en el caso del apoplasto del clavel, se evaluó el efecto que tiene la cantidad de proteína y el uso de diferentes rangos de pH en la separación durante la primera dimensión, sobre el número de manchas *spots* y la resolución de los mismos. Si bien es cierto que el uso de gradientes de pH más estrechos aumentan la resolución y facilitan los estudios comparativos, usar estos rangos puede obviar información relevante para la especie vegetal objeto de estudio, dependiendo de las proteínas contenidas en la muestra.

En este estudio, se describe el flujo de trabajo para la selección de las condiciones experimentales más adecuadas para el análisis de proteínas presentes en el apoplasto de raíces y tallos de clavel, incluyendo tanto las condiciones de extracción de fluido apoplástico, como las usadas para análisis electroforéticos de alta resolución (electroforesis en 1D y 2D, por ejemplo). Para ello, se evaluaron diferentes condiciones: selección de la solución de infiltración en la obtención del fluido apoplástico, selección del método de precipitación de proteínas y selección de condiciones para electroforesis en 1D SDS-PAGE y 2D IEF-SDS-PAGE. Estas condiciones experimentales podrán ser empleadas posteriormente en análisis proteómicos para la identificación de proteínas relacionadas con resistencia al marchitamiento vascular generado por el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* (Fod), patógeno que causa las mayores pérdidas económicas en el cultivo de esta flor. Así mismo, este flujo de trabajo propuesto puede ser usado para la selección de condiciones experimentales en el estudio inicial de las proteínas del apoplasto en otras especies vegetales.

## Materiales y métodos

### Material Vegetal

Se emplearon tallos y raíces de esquejes indexados de clavel (*Dianthus caryophyllus* L.), libres de patógenos, con tres a cuatro semanas de enraizamiento de la variedad Golem y de la variedad Gran Slam, donados por la empresa Florval S.A.S-Sede QFC (Gachancipá- Cundinamarca, Colombia).

### Preparación del inóculo de *Fod*

El hongo aislado empleado en este experimento fue previamente revirulentado en la variedad de clavel-Solex que es altamente susceptible al marchitamiento vascular generado por *Fod*. Este microorganismo se cultivó en PDA (Papa Dextrosa Agar, Merck) durante cinco días. Dos cm<sup>2</sup> del medio colonizado por el hongo se transfirieron a medio líquido Czapek-Dox-Broth (Fluka); la suspensión resultante permaneció en agitación durante cinco días a 200 rpm y 25 °C. Posteriormente, se filtró en condiciones asépticas para retirar el micelio del sobrenadante y se llevó a una concentración  $1 \times 10^6$  conidias/mL (por conteo con el hematocitómetro).

### Inoculación del material vegetal con el patógeno

La inoculación de los esquejes se realizó de acuerdo con las condiciones establecidas en Higuera (22). Los esquejes control y los inoculados se sembraron y mantuvieron bajo las mismas condiciones por los días de duración del ensayo: con riego de agua por aspersión, bajo condiciones constantes de temperatura, radiación fotosintéticamente activa y humedad relativa (22).

### Selección de las condiciones de extracción del fluido apoplástico de clavel

La extracción del fluido apoplástico de clavel fue realizada empleando la técnica de infiltración con vacío-centrifugación (8) con algunas modificaciones. Se emplearon 5,0 g de tallos o raíces de clavel cortados en segmentos de 0,5-1,0 cm de longitud. Para la infiltración, el material vegetal se colocó dentro de tubos falcon (50 mL) y se adicionaron 20 mL de solución de infiltración. Posteriormente, empleando una bomba de vacío de paleta Gast G588DX, se realizaron 3 pulsos de vacío de 20 s con intervalos de 30 s, generando una presión de 70 kPa.

Los tallos o raíces fueron infiltrados con las siguientes soluciones de infiltración: 1. Tris-HCl 50 mM pH 8,0/NaCl 50 mM/ $\beta$ -mercaptoetanol 0,1 % v/v; 2. Tris-HCl 50 mM pH 8,0/NaCl 0,6 M/ $\beta$ -mercaptoetanol 0,1 % v/v; 3. NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1 M pH 6,5/NaCl 50 mM/ $\beta$ -mercaptoetanol 0,1 % v/v; 4. NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1 M pH 6,5/NaCl 0,6 M/ $\beta$ -mercaptoetanol 0,1 % v/v; 5. agua/ $\beta$ -mercaptoetanol 0,1 % v/v y 6. NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1 M pH 6,5/NaCl 50 mM. La selección de la solución de infiltración se realizó teniendo en cuenta el rendimiento (mg proteína/g material vegetal base seca), contaminación con proteínas intracelulares y calidad en la separación en 1D SDS-PAGE.

Posteriormente, los fragmentos de material vegetal se filtraron al vacío durante 5 s y se transfirieron a un tubo falcon de 50 mL con un aditamento especial, un círculo de plástico con orificios, que permitió separar el fluido apoplástico de las raíces o los tallos empleados, por centrifugación a 1000 x g durante 20 min a 4 °C (23).

Para la obtención de una mayor cantidad de fluido apoplástico se realizaron ensayos empleando una segunda centrifugación sobre el mismo material vegetal. El fluido apoplástico fue colectado en la parte inferior del tubo y los extractos se guardaron a -20 °C.

### Verificación de contaminación intracelular

Para evaluar si los fluidos apoplásticos obtenidos presentaban contaminación con proteínas intracelulares, generada por un posible rompimiento de las membranas plasmáticas, se determinó la actividad de dos enzimas intracelulares. La malato deshidrogenasa (MDH), empleada para estimar el nivel de daño en la membrana celular, y la  $\alpha$ -manosidasa, como marcador de proteínas procedentes de vacuola (1).

La actividad MDH fue determinada por un método modificado a partir de lo reportado por Zhang *et al.* (24). La actividad enzimática fue medida de acuerdo a la disminución en la absorbancia a 340 nm durante 90 s; por adición de 10  $\mu$ L de fluido apoplástico a 300  $\mu$ L de la mezcla de reacción (oxaloacetato (C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>5</sub>) 0,17 mM y NADH 0,094 mM disueltos en solución amortiguadora Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1 M pH 7,4.) a 20 °C, usando un espectrofotómetro (Genesys uv 10, ThermoFisher, USA). El mismo sistema de reacción, únicamente con adición de buffer fue empleado como blanco. La actividad se expresó en porcentaje relacionado con un extracto total, donde el material vegetal fue macerado con nitrógeno líquido para romper las membranas celulares.

La actividad  $\alpha$ -manosidasa fue determinada por un método modificado por Ramírez (23), a partir de lo reportado por Boller y Kende (25), en donde se emplean 100  $\mu$ L del sustrato p-nitrofenol- $\alpha$ -manopiranosido 5 mM disuelto en solución amortiguadora CH<sub>3</sub>COONa-CH<sub>3</sub>COOH 0,01 M pH 4,0 y 20  $\mu$ L de fluido apoplástico. Las muestras se incubaron durante 2 h a 37 °C. La reacción se detuvo con 1,1 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,2 M y se midió la absorbancia a 420 nm empleando un espectrofotómetro (Genesys uv 10, ThermoFisher, USA). La actividad para estas dos enzimas, se expresó en porcentaje en relación con un extracto total, donde el material vegetal fue macerado con nitrógeno líquido para romper las membranas celulares.

### Efecto del $\beta$ -mercaptoetanol en la solución de infiltración

Para identificar el efecto de la adición de un agente reductor ( $\beta$ -mercaptoetanol) en la extracción del fluido apoplástico de raíces y tallos de clavel, se realizó un ensayo empleando las soluciones de infiltración 3 y 6. La selección de las condiciones se realizó teniendo en cuenta el rendimiento (mg proteína/g material vegetal base seca), contaminación con proteínas intracelulares y calidad en la separación en 1D SDS-PAGE.

## Precipitación de proteínas

Con el fin de eliminar interferentes que pueden llegar a afectar la separación y análisis electroforéticos posteriores, las proteínas contenidas en los diferentes extractos fueron precipitadas empleando dos métodos diferentes, uno basado en la precipitación con ácido tricloroacético (TCA)-acetona y el otro basado en la precipitación con TCA-acetona y subsecuente extracción con fenol (16).

Para el método TCA-acetona se partió de 1 mL de fluido apoplástico y se adicionó 1 mL de TCA al 10% *p/v* con ditioneitol (DTT) 0,07% *p/v* en acetona. Los tubos se agitaron y se mantuvieron a 4 °C durante toda la noche. Luego de centrifugar a 16000 x g durante 15 min a 4 °C, el sobrenadante se descartó y al pellet se le hicieron 4 lavados, 3 de ellos con 1 mL de acetona pura y finalmente 1 con acetona al 80% (*v/v*), centrifugando a 16000 x g durante 5 minutos a 4 °C, después de cada paso de lavado. El pellet resultante se secó a temperatura ambiente para eliminar los residuos de acetona.

Para el método TCA-acetona con posterior extracción con fenol, se partió de 1 mL de fluido apoplástico y se adicionó 1 mL de TCA al 100% *p/v* en acetona. Los tubos se agitaron y se mantuvieron a 4 °C durante toda la noche. Luego de centrifugar a 16000 x g durante 15 min a 4 °C, el sobrenadante se descartó y el pellet se resuspendió en 1 mL de una mezcla (1:1) de fenol saturado y solución amortiguadora de lisis (sacarosa 30% *p/v*, SDS 2% *p/v* y  $\beta$ -mercaptoetanol 5% *v/v*). Después de homogenizar vigorosamente con la punta de la micropipeta e incubar por 5 min en hielo, se centrifugó a 16000 x g durante 5 min a 4 °C. La fase fenólica (superior) se transfirió a un tubo nuevo y se le adicionó 1 mL de acetato de amonio 0,1 M en metanol. Luego de dejar precipitar toda la noche a -20 °C, se centrifugó a 16000 x g durante 5 min a 4 °C para eliminar finalmente el sobrenadante por decantación. El pellet resultante se lavó con 1 mL de metanol al 100% y posteriormente con 1 mL de acetona al 80%, realizando centrifugaciones en cada caso a 16000 x g durante 5 min a 4 °C. Finalmente, el pellet se secó a temperatura ambiente para eliminar los residuos de acetona.

Para la separación de las proteínas por electroforesis los pellets obtenidos por ambos métodos (TCA-acetona o TCA-acetona/fenol) fueron resuspendidos en 100  $\mu$ L o 50  $\mu$ L de solución de solubilización (urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS 4% (*p/v*), Tritón X-100 0,5% (*p/v*) y DTT 100 mM), de acuerdo a si la muestra de fluido apoplástico provenía de tallo o raíz, respectivamente; las muestras se agitaron por 4 horas a 4 °C. La selección del protocolo de extracción de proteínas se realizó teniendo en cuenta la cantidad de proteína obtenida ( $\mu$ g proteína/g material vegetal peso fresco) y la calidad de la separación en 1D SDS-PAGE.

La cuantificación de proteínas provenientes de fluido apoplástico de clavel se realizó empleando el método de Bradford (26), de acuerdo a la modificación de Ramagli (27), empleando el reactivo de Bio-Rad®. Para ello se tomaron 1  $\mu$ L de muestra, 250  $\mu$ L del reactivo de Bradford y 749  $\mu$ L de agua ultrapura. Las muestras se procesaron con réplica técnica, midiendo la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro (Genesys uv 10, ThermoFisher, USA). Se utilizó Albúmina Sérica Bovina (BSA) como estándar de proteína.

## Electroforesis SDS-PAGE

Dentro de las condiciones evaluadas para la separación de proteínas presentes en el fluido apoplástico de raíces y tallos de clavel se tuvieron en cuenta el tiempo de calentamiento de las muestras (5 y 10 min) y la cantidad de proteína empleada (5, 10, 15 y 20  $\mu$ g), esto con el fin de definir las condiciones fundamentales para obtener la mejor calidad de los geles de electroforesis en 1D.

Se emplearon geles discontinuos de poli(acrilamida en formato de 7 cm, empleando 5% para el gel de concentración y 12% para el gel de resolución, bajo condiciones reductoras con  $\beta$ -mercaptoetanol. La electroforesis se corrió a corriente constante (13 mA en el gel de concentración y 18 mA en el gel de resolución) según protocolo de Bio-Rad® en el equipo Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad, California, USA), usando como buffer de corrido Tris base 25 mM, glicina 0,20 M y SDS 0,10% *p/v*. Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie coloidal G-250 (ver Visualización de proteínas).

El análisis de la metodología seleccionada en muestras de fluido apoplástico proveniente de claveles control e inoculados fue realizada empleando el sistema Stain-Free Criterion de Bio-Rad®, USA, con geles preteñidos y prefabricados con un gradiente continuo del 4 al 20% y como marcador de peso molecular Precisión Plus Protein Standards Bio-Rad®, USA. Esto se realizó con el fin de determinar con la mayor sensibilidad posible los cambios en los perfiles electroforéticos por efecto de la infección con el patógeno. Se emplearon 20  $\mu$ g de proteína por muestra, procedente de fluido apoplástico de tallo y raíz, y la separación se realizó a voltaje constante (150 V), empleando como buffer de corrido Tris-Base 25 mM, glicina 0,20 M y SDS 0,10% *p/v*.

## Visualización de proteínas

Para los geles de poli(acrilamida al 12%, se realizó tinción con azul de Coomassie coloidal G-250 (20). El protocolo consistió en la incubación de los geles con la solución de tinción (metanol 20% *v/v*, sulfato de amonio 0,8% *p/v*, ácido fosfórico 2,25% *v/v* y Coomassie coloidal G-250 0,1% *p/v*) durante 72 h. El exceso del agente de tinción se eliminó mediante lavados con agua ultrapura durante 5 min, solución de metanol al 25% *v/v* durante 5 min y solución de sulfato de amonio al 20% *p/v* para mantenerlos. Los geles del sistema Stain-Free Criterion de Bio-Rad®, USA, fueron visualizados usando el equipo Criterion Stain Free™ - Gel Imaging System de Bio-Rad®, USA.

La calidad de la separación se evaluó en cada órgano de la planta determinando tanto el número de bandas obtenido para cada uno de los tratamientos ensayados, como la resolución en la separación de las mismas. Para los diferentes ensayos se usó el programa Image Lab de Bio-Rad®, USA.

## Electroforesis 2D

### Primera dimensión-enfoque isoelectrico (IEF)

Para la separación en la primera dimensión se usaron tiras IPG (Inmovilized pH Gradient) de 11 cm, en el rango de pH 3-10 y pH 5-8 Bio-Rad®, USA. Se usaron 100  $\mu$ g o 200  $\mu$ g de proteína de cada órgano y se mezclaron con solución de hidratación (urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS 4% *p/v*, azul de bromofenol 0,1% *p/v*, DTT 100 mM y anfolitos 0,2% *v/v* en el rango de pH 3-10 o 5-8 según las tiras empleadas), hasta completar 185  $\mu$ L.



El isoelectroenfoque se corrió en el equipo Protean IEF cell (Bio-Rad®, California, USA), aplicando las siguientes condiciones: 16 h de rehidratación activa a 50 V; 250 V, 15 min; 8000 V, 1 h 30 min; 8000 V/h hasta acumular 30000 V y 500 V 1 h. Se empleó una temperatura de 20 °C y una corriente de 50 µA por tira. Una vez finalizado el programa, las tiras IPG se almacenaron a -20 °C (16).

### Segunda dimensión-SDS-PAGE

Antes de realizar la electroforesis SDS-PAGE, las tiras se sometieron a un proceso de equilibrio, como indica Ardila *et al.* (16). Para la segunda dimensión se usaron geles prefabricados del sistema Criterion de Bio-Rad®, USA, con un gradiente de 4 a 20%, empleando el patrón de peso molecular antes mencionado. La tira y el marcador de peso molecular se colocaron sobre la superficie del gel; posteriormente este se selló con agarosa al 1% *p/v* mezclada con azul de bromofenol 0,001 % *p/v*. La segunda dimensión se corrió a 150 V constantes, en una cámara del sistema Criterion de Bio-Rad®, USA.

### Análisis de imágenes 2 DE

Las imágenes de los geles 2DE se adquirieron empleando el equipo Stain-Free Criterion™ Gel Imaging System de Bio-Rad®, USA. El análisis de la imagen se realizó con el programa PDQuest 7.2 Bio-Rad®, utilizando parámetros para la detección de *spots*. Además, se evaluó de manera visual la presencia de *striking* en los diferentes geles obtenidos para extractos de tallos y raíces de clavel, para determinar la existencia de contaminantes no proteicos y la separación de las proteínas teniendo en cuenta la cantidad aplicada y el rango de pH empleado en las tiras del isoelectroenfoque.

### Análisis estadístico

Para el rendimiento en la obtención de proteínas con las diferentes soluciones de infiltración se realizó un análisis estadístico, igualmente para el análisis de las actividades enzimáticas empleadas como marcadores de contaminación intracelular y para la selección del método de precipitación de proteínas, evaluados a través triplicados biológicos. Los datos fueron reportados como medias  $\pm$  SD. El análisis de varianza y las diferencias significativas entre las medias se analizaron mediante ANOVA de una vía utilizando Statgraphics® Software versión 5.1. ( $p < 0,05$ ).

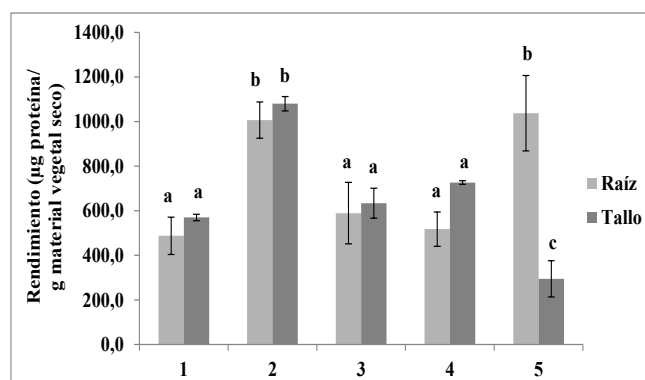
## Resultados y discusión

### Obtención de fluido apoplástico de clavel

#### Selección de la solución de infiltración

De las cinco soluciones de infiltración evaluadas, se encontró que el mayor rendimiento de extracción para proteínas apoplásticas de raíces y tallos de clavel se obtuvo con la solución amortiguadora número 2 (Figura 1).

Sin embargo, la selección de la solución de infiltración debe considerar la actividad enzimática  $\alpha$ -manosidasa y malato deshidrogenasa (MDH), indicadores de la contaminación con proteínas intracelulares (1, 24, 25). Al respecto, se encontró que para el caso de la actividad MDH en los fluidos apoplásticos obtenidos, el  $\beta$ -mercaptoetanol puede actuar como interferente, debido a su carácter reductor (Tabla 1).



**Figura 1.** Rendimiento en la obtención de proteínas presentes en fluido apoplástico de tallos y raíces de clavel variedad Gran Slam, empleando las soluciones de infiltración 1-5. Las barras verticales representan la desviación standard de cada promedio ( $n = 3$ ). Los valores para cada variedad y cada determinación que presentan diferente letra, presentan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

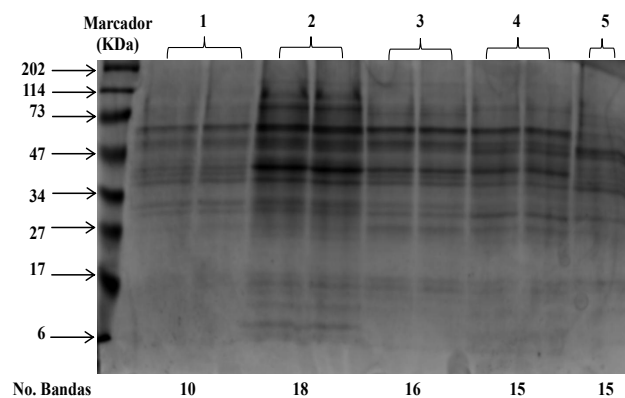
**Tabla 1.** Determinación de las enzimas MDH y  $\alpha$ -manosidasa en fluido apoplástico de tallos y raíces de clavel, empleando cinco diferentes soluciones de infiltración

Solución	Material vegetal	MDH (%)	$\alpha$ -manosidasa (%)	Material vegetal	MDH (%)	$\alpha$ -manosidasa (%)
1	Raíz	N.D	3,79 <sup>b</sup>	Tallo	N.D	5,19 <sup>b</sup>
2	Raíz	N.D	24,5 <sup>a</sup>	Tallo	N.D	8,66 <sup>a</sup>
3	Raíz	N.D	0,273 <sup>d</sup>	Tallo	N.D	0,0125 <sup>e</sup>
4	Raíz	N.D	0,619 <sup>c</sup>	Tallo	N.D	0,498 <sup>d</sup>
5	Raíz	N.D	3,67 <sup>b</sup>	Tallo	N.D	1,23 <sup>c</sup>

Los resultados se presentan como el promedio de tres determinaciones. N.D: No detectado

Por el contrario, para el caso de la actividad  $\alpha$ -manosidasa, no se observa efecto en el método de determinación cuando dicho agente está presente en las soluciones de infiltración evaluadas (Tabla 1). Los resultados encontrados muestran que los valores más bajos de contaminación intracelular, al nivel de significancia trabajado ( $p < 0,05$ ), se obtienen al emplear la solución amortiguadora número 3. Se presentaron valores menores al 0,3% respecto a la actividad encontrada para el extracto crudo, lo cual está dentro de los valores reportados en otras investigaciones, como es el caso del fluido apoplástico proveniente de papa (*Solanum tuberosum* L. variedad Spunta y variedad Innovator) en su interacción con el patógeno *Phytophthora infestans* (5).

En cuanto a la evaluación de los perfiles de separación de las proteínas por SDS-PAGE, se evidencia que el mayor número de bandas se obtiene con la solución amortiguadora número 2 (Figura 2, carril 2). Sin embargo, es probable que este mayor número de bandas se deba a la presencia de proteínas intracelulares, en concordancia con los resultados previamente descritos que sugieren contaminación intracelular al usar dicha solución de infiltración (Tabla 1).



**Figura 2.** 1D SDS-PAGE para la comparación de las diferentes soluciones de infiltración empleadas en la extracción de fluido apoplástico de tallos de clavel variedad Gran Slam. 20 µg proteína, empleando un gel de separación al 12% y un gel de concentración al 5%

Estos resultados contrastan con lo encontrado con la solución de infiltración número 3 (Figura 2, carril 3), en donde además de presentar baja contaminación intracelular (actividad  $\alpha$ -manosidasa del 0,3% comparada con el 24,5% obtenida para la solución número 2), el número de bandas es superior al encontrado con las demás soluciones de infiltración evaluadas. Lo anterior indica que dicha solución es una buena candidata para ser usada en la obtención de proteínas a partir del apoplasto de tallos de clavel. Resultados similares se encontraron para fluido apoplástico procedente de raíces de clavel (datos no mostrados).

Resultados reportados en la literatura para la extracción de fluido apoplástico de hojas maíz muestran que al emplear  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ - $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  100 mM como solución amortiguadora, se presenta poco daño en la membrana plasmática y buena extracción de proteínas adheridas a la pared celular (15).

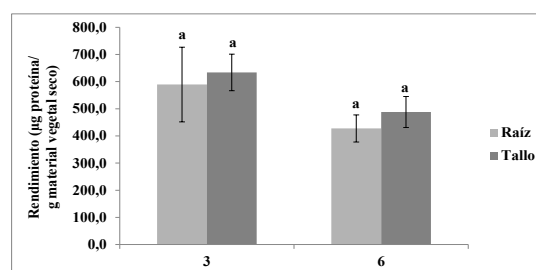
La presencia de bandas de proteínas con un peso molecular menor a 15 kDa es significativa en los extractos obtenidos con la solución de Tris-HCl de mayor fuerza iónica (Figura 2, carril 2). Esto no es común en el apoplasto, donde estas proteínas normalmente se encuentran en niveles bajos (15). Es probable que la baja polaridad del tris conlleve a una disrupción de las membranas plasmáticas de las células que constituyen el tejido y generen una mayor contaminación con proteínas intracelulares de este tamaño.

En conjunto, estos resultados indican que para la obtención de fluido apoplástico de tejido vegetal de clavel, se debe emplear la solución de infiltración número 3 con pH 6,5, baja fuerza iónica y presencia de agente reductor. Estos resultados sin duda, deben estar asociados a la similitud en términos de pH y fuerza iónica que existe entre esta solución de infiltración y las condiciones encontradas en tejidos vegetales.

Considerando que la centrifugación es un paso determinante para la obtención de un extracto libre de contaminantes intracelulares y en la cantidad de fluido apoplástico obtenido, se decidió evaluar la posibilidad de realizar centrifugaciones adicionales para aumentar la cantidad final de fluido apoplástico. Se determinó que una segunda centrifugación permite aislar más fluido apoplástico sin contaminación intracelular, según la determinación del marcador  $\alpha$ -manosidasa (Resultados no mostrados). Esto sugiere que la centrifugación adicional a 1000 x g puede ser empleada para obtener una mayor cantidad de extracto sin contaminación por ruptura celular, resultados que no han sido reportados previamente, en otras especies vegetales.

### Uso de agentes reductores

Considerando que el uso de agentes reductores como el  $\beta$ -mercaptoetanol puede aumentar la estabilidad y la solubilidad de las proteínas, pero que, a su vez, puede interferir en uno de los marcadores de contaminación intracelular (como la actividad enzimática de la MDH), se decidió evaluar si realmente era necesario su uso en la solución de infiltración previamente seleccionada. Para ello, se realizaron ensayos usando la solución amortiguadora de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ - $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,1 M pH 6,5/ $\text{NaCl}$  50mM con y sin  $\beta$ -mercaptoetanol 0,1% v/v y se compararon parámetros como el rendimiento, la contaminación intracelular y los perfiles de separación por electroforesis en 1D. De acuerdo a los resultados obtenidos (Figura 3), no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los dos tratamientos evaluados en términos del rendimiento de extracción ( $p < 0,05$ ). Así mismo, la comparación de la actividad  $\alpha$ -manosidasa tampoco muestra diferencias entre los mismos (Tabla 2), lo que indica que el uso de este agente reductor no afecta la estabilidad de la membrana plasmática durante el proceso de infiltración.



**Figura 3.** Rendimiento de la obtención de proteínas presentes en fluido apoplástico de tallos y raíces de clavel, variedad Gran Slam, empleando solución de infiltración con y sin adición de un agente reductor. Las barras verticales representan la desviación standard de cada promedio ( $n = 3$ ). Los valores para cada variedad y cada determinación que presentan diferente letra, presentan diferencias significativas ( $p < 0,05$ )

**Tabla 2.** Determinación de las enzimas MDH y  $\alpha$ -manosidasa en fluido apoplástico de tallos y raíces de clavel, empleando solución de infiltración con y sin adición de un agente reductor

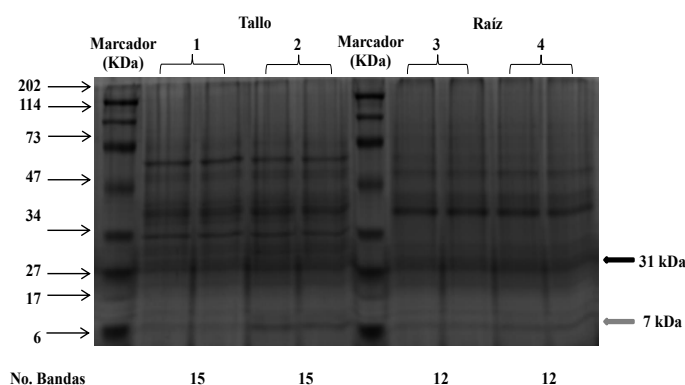
Solución	Material vegetal	MDH %	$\alpha$ -manosidasa (%)	Material vegetal	MDH %	$\alpha$ -manosidasa (%)
3	Raíz	N.D	0,273 <sup>a</sup>	Tallo	N.D	0,0125 <sup>a</sup>
6	Raíz	1,16	0,258 <sup>a</sup>	Tallo	1,21	0,0433 <sup>a</sup>

Los resultados se presentan como el promedio de tres determinaciones. N.D.: No detectado

El efecto que presentan el pH, la fuerza iónica y las características químicas de los componentes de la solución de extracción previamente seleccionada ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ - $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,1 M pH 6,5/ $\text{NaCl}$  50 mM) sobre la estabilidad de la membrana, se puede comprobar con la determinación de la actividad MDH en fluido apoplástico obtenido con esta solución sin agente reductor. Considerando que su actividad es apenas el 1% con respecto al valor obtenido para extracto crudo, se evidencia que no existe contaminación citoplasmática al usar dicha solución (Tabla 2). Estos resultados son similares a los encontrados en otros estudios (28) en donde se ha observado que la actividad enzimática MDH de los fluidos de apoplasto es apenas del 1 al 3% del valor obtenido para un extracto crudo de la misma especie vegetal (29). En general, estos resultados son considerados bajos si se tiene en cuenta que hay reportes donde se han tolerado valores en el rango del 3 al 10% (30).

La localización citoplásmica de la MDH permite que la determinación de su actividad sea comúnmente usada como marcador de la calidad del fluido apoplástico obtenido; la baja o ausencia de actividad para esta enzima indica una pobre o ausente contaminación con proteínas citoplasmáticas (1, 3). Así mismo, los resultados obtenidos para la solución amortiguadora  $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$  0,1 M pH 6,5/ $\text{NaCl}$  50 mM, con y sin agente reductor, no muestran diferencias significativas en cuanto a rendimiento y contaminación intracelular (Tabla 2 y Figura 3).

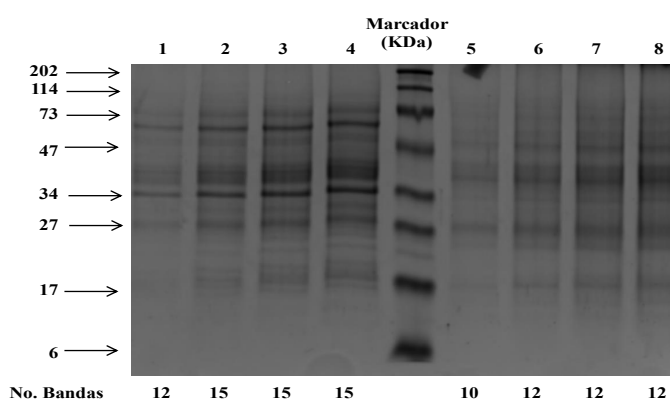
Sin embargo, al realizar la electroforesis 1D SDS-PAGE, se determinó que existe mayor intensidad en las bandas de proteínas con peso molecular de aprox. 31 KDa y 7 KDa, cuando se emplea  $\beta$ -mercaptoetanol dentro de la solución de infiltración (Figura 4, carril 2). Esto indica que es necesario el uso de éste dentro de la solución de infiltración a emplearse en esta parte del proceso. Estos resultados son predecibles, considerando que la presencia de este agente reductor en la solución de infiltración evita la posible formación de puentes disulfuro entre proteínas que presenten grupos sulfhidrilo libres, que en este caso tienen pesos moleculares de 31 y 7 kDa. La posible formación de estructuras oligoméricas bajo condiciones no reductoras es un fenómeno previamente descrito para varias proteínas en otros modelos (31, 32).



**Figura 4.** 1D SDS-PAGE para la comparación del efecto de un agente reductor presente en la solución de infiltración empleada en la obtención de fluido apoplástico de tallo y raíz de clavel, variedad Golem. Se emplearon 10 µg proteína, gel de separación al 12% y gel de concentración al 5%. Al lado derecho del gel se encuentran señaladas las bandas de interés (6,7 kDa para tallo y 30, 6 kDa en tallo y raíz)

### Electroforesis SDS-PAGE

Se deben tener en cuenta también algunos parámetros experimentales para la obtención de una buena resolución en los geles de proteínas en SDS-PAGE, por ejemplo, el tiempo de calentamiento de la muestra y la cantidad de proteína sembrada en cada pozo del gel. En el formato empleado en la presente investigación (7 cm), se encontró que un tiempo de calentamiento de 10 min permite aumentar la nitidez de las bandas, debido a que probablemente en este tiempo se presenta una mayor interacción entre los agentes denaturantes presentes en el buffer carga y las proteínas del extracto (Resultados no mostrados). En cuanto a la cantidad de proteína empleada, se encontró que a partir de 10 µg (Figura 5, carril 2 y 6) se presenta una buena sensibilidad para la detección de las bandas, lo cual representa una gran ventaja dado que la cantidad de proteína obtenida a partir de fluido apoplástico es baja, alrededor de 100 µg proteína/g material vegetal peso fresco (Tabla 3).



**Figura 5.** 1D SDS-PAGE para la comparación de diferentes cantidades de proteínas presentes en extractos de proteínas provenientes del fluido apoplástico de tallo y raíz de clavel, variedad Golem, empleando la solución de infiltración número 3 y diferentes cantidades de proteína. Gel de separación al 12% y gel de concentración al 5%. Tallo, 5 µg (carril 1), 10 µg (carril 2), 15 µg (carril 3), 20 µg (carril 4), Raíz 5 µg (carril 5), 10 µg (carril 6), 15 µg (carril 7), 20 µg (carril 8)

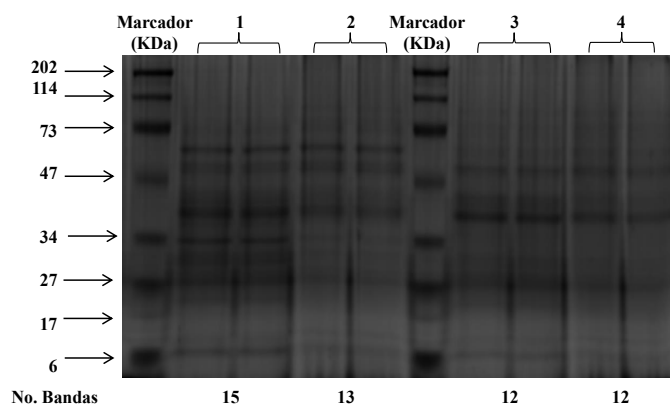
**Tabla 3.** Rendimiento para los diferentes métodos de extracción de proteínas presentes en fluido apoplástico de tallos y raíces de clavel. TCA/acetona (A) y TCA/acetona/fenol (B)

Rendimiento (µg proteína/g material vegetal peso fresco)	Procedimiento A.	%Recuperación	Procedimiento B.	%Recuperación
Tallo	119,4 ± 14,7 <sup>a</sup>	100,0	72,7 ± 1,3 <sup>b</sup>	60,4
Raíz	142,0 ± 20,4 <sup>a</sup>	100,0	62,5 ± 8,4 <sup>b</sup>	44,0

Los resultados se presentan como el promedio de tres determinaciones ± la desviación estándar

### Precipitación y concentración de proteínas para electroforesis

En este caso, se emplearon dos métodos reportados para precipitación de proteínas de tallos y raíces de clavel (16). El método A se basa en el uso de TCA/acetona y el método B, se basa en el uso de TCA/acetona/fenol. La selección se realizó teniendo en cuenta el rendimiento en la cantidad de proteína finalmente solubilizada determinada por Bradford (Tabla 3) y la separación en 1D SDS-PAGE (Figura 6).



**Figura 6.** Geles de extractos de proteínas obtenidas usando 1 método ATC/acetona en tallo, 2 método ATC/acetona/fenol en tallo, 3 método ATC/acetona en raíz, 4 método ATC/acetona/fenol en raíz. Se emplearon 10 µg de proteína en cada carril y un gel de poliácridamida-SDS al 12%. El gel fue teñido con Coomassie coloidal. Las muestras empleadas provienen de fluido apoplástico de tallo y raíz de clavel variedad Golem, empleando la solución de infiltración número 3

Los resultados obtenidos muestran que al emplear el método B, se presenta una menor recuperación de proteína a la obtenida con el método A presentando un 60,4% y 44,0% de lo obtenido con el método A, para tallo y raíz respectivamente (Tabla 3). Por otro lado, al evaluar el número de bandas durante la separación de las proteínas presentes en los diferentes extractos mediante electroforesis en 1D SDS-PAGE (Figura 6) se encontró que, si bien es cierto que los dos métodos empleados no presentan contaminantes que afecten la calidad de la separación y la resolución de las bandas, sí se presentan diferencias en el número de bandas que corroboran los resultados obtenidos en rendimiento.

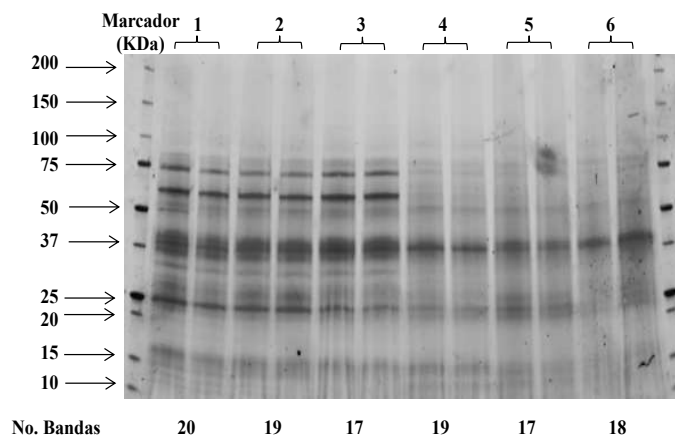
Se encontró a través del método B un menor número de bandas (Figura 6, carriles 2 y 4), debido probablemente a la pérdida de proteínas durante el procedimiento experimental descrito. Esto indica que para la precipitación de proteínas presentes en el fluido apoplástico de tallos y raíces de clavel, se debe emplear el método A que incluye únicamente el tratamiento con TCA y acetona, tal y como ha sido reportado en estudios con otras especies vegetales (19, 33, 34). En general, estos resultados contrastan con lo encontrado en estudios previos realizados con el grupo de investigación, donde el método que incluye fenol presenta los mejores resultados en términos de número de bandas y presencia de contaminantes no proteicos para extractos totales de tallos y raíces (16). Lo anterior debido a que el fenol es uno de los agentes disociadores más fuertes que disminuye las interacciones entre las proteínas y diversos contaminantes (35-37).

Los resultados encontrados en clavel muestran claramente cómo el método de precipitación y concentración de proteínas depende de la complejidad de la muestra a trabajar ya que, cuando se parte de material vegetal total, es necesario emplear el método TCA/acetona/fenol para eliminar interferentes en análisis electroforéticos como carbohidratos, ácidos nucleicos, fenoles, lípidos y sales (20). Por el contrario, para el caso del fluido apoplástico, debido a que es una muestra que presenta un menor número de moléculas interferentes, el método TCA/acetona es suficiente para generar una muestra que pueda ser empleada en análisis electroforéticos, contando además con un buen rendimiento en la obtención de proteínas, necesario en este tipo de estudios donde la cantidad de fluido apoplástico obtenido a partir de material vegetal es tan bajo.

#### Electroforesis SDS-PAGE de muestras inoculadas con *Fod*

Con el fin de verificar que las condiciones seleccionadas fueran adecuadas para el análisis de proteínas del fluido apoplástico de raíces y tallos de clavel, durante la inoculación con el patógeno *Fod*, se realizó un análisis diferencial cualitativo de las bandas de proteínas presentes en el apoplasto de dichos tejidos, comparando con el correspondiente control. De esta manera, bajo las condiciones previamente descritas se realizaron extracciones de apoplasto a partir de material vegetal sin inocular con el patógeno (día 0 y día 7, control) e inoculado con el mismo (día 7) (Figura 7). Los resultados muestran que las condiciones seleccionadas pueden ser usadas de manera exitosa, tanto para tejidos control, como para aquellos que han sido inoculados con el patógeno.

Al comparar los diferentes tratamientos se evidencia que no existen diferencias cualitativas entre las proteínas presentes en el apoplasto de las muestras control y las muestras inoculadas, al menos bajo las condiciones de detección empleadas.



**Figura 7.** 1D SDS-PAGE para la comparación de extractos de proteínas en diferentes tiempos y con inoculación con FOD provenientes del fluido apoplástico de tallo y raíz de clavel, empleando la solución de infiltración número 3. 20 µg de proteína. Gel Criterion Stain Free™ Bio Rad, USA. Gradiente 4-20%. 1 Tallo día 0 control, 2 Tallo día 7 control, 3 Tallo día 7 inoculado, 4 Raíz día 0 control, 5 Raíz día 7 control, 6 Raíz día 7 inoculado

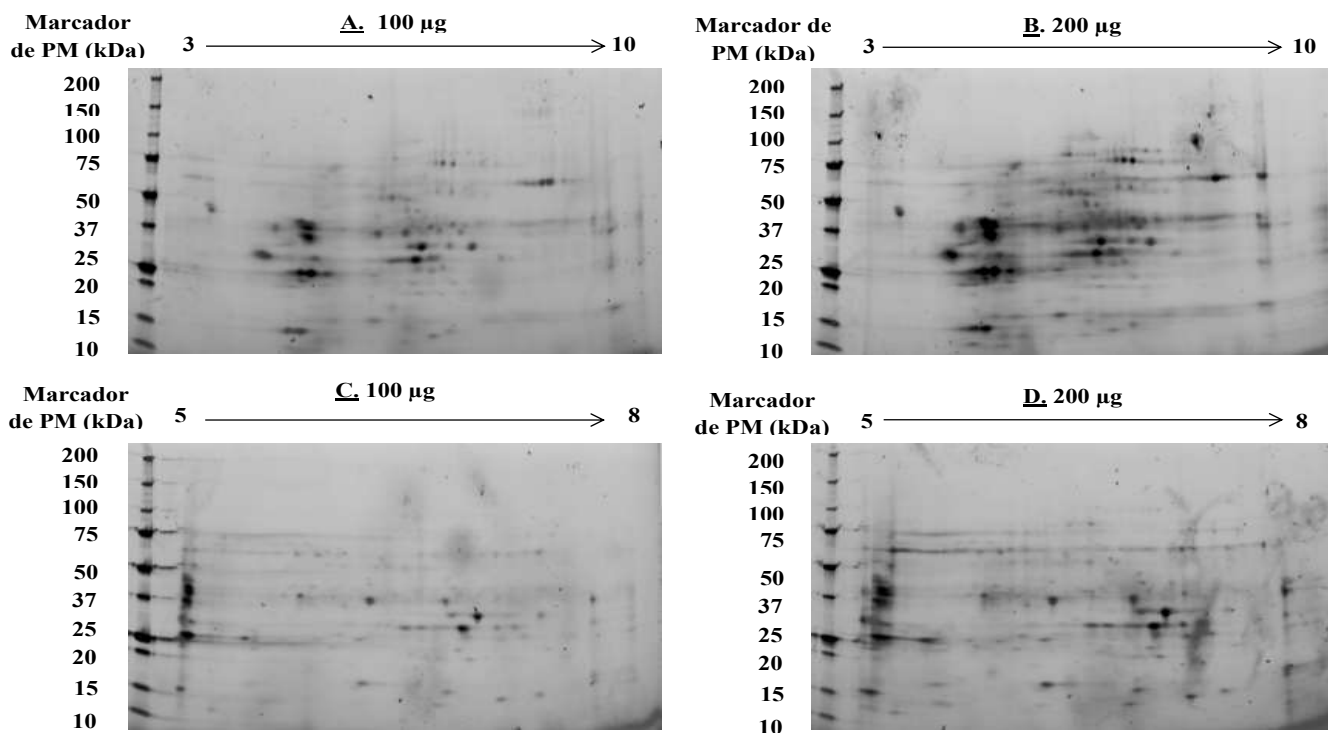
Estos resultados son similares a los encontrados en trabajos previos realizados en el grupo de investigación, donde no se presentan diferencias cualitativas apreciables en el número de bandas en extractos totales de proteínas, entre controles e inoculados con el patógeno usando electroforesis en 1D (16). Los resultados obtenidos en esta parte de la investigación muestran además que la metodología puede ser empleada de manera confiable para análisis de proteínas provenientes de fluido apoplástico, de tallos y raíces control e inoculados con el patógeno.

#### Análisis de apoplasto de raíces y tallos de clavel por 2DE (IEF-SDS-PAGE)

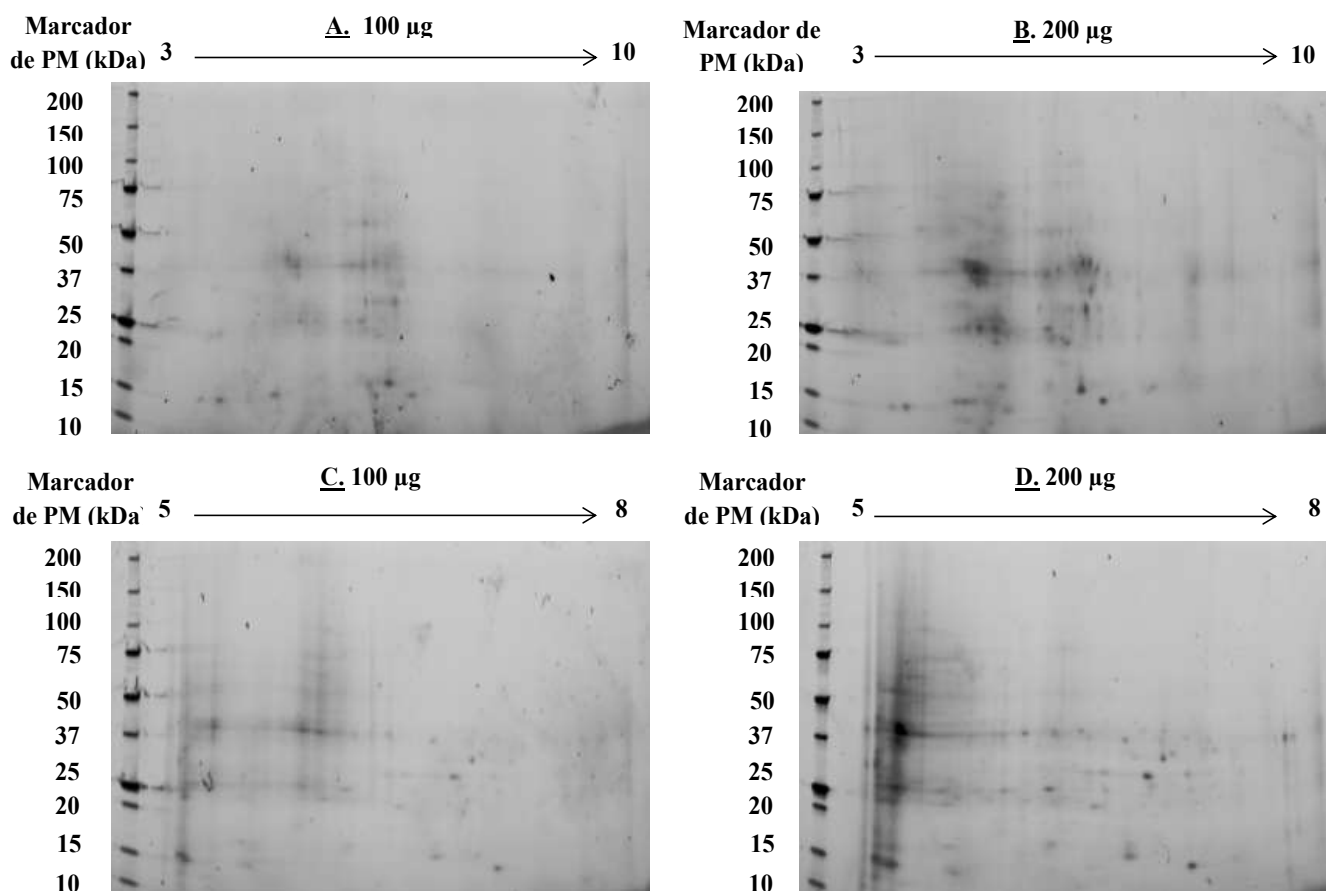
La Figura 8 muestra los resultados obtenidos para proteínas apoplásticas de tallo, donde se encuentra un mayor número de manchas y una mayor resolución durante la separación, al emplear tiras de IPG en el rango de pH 3-10 (Tabla 4). Los resultados obtenidos en este órgano son similares a los obtenidos en estudios proteómicos del apoplasto de hojas de colza (*Brassica napus*) en su interacción con *Verticillium longisporum*, donde se encuentran 170 spots, empleando 80 µg de proteína y tiras de IPG pH 3-10 (3).

Para el caso de la raíz (Figura 9), empleando 200 µg de proteína y tiras de IPG pH 5-8, la resolución en las manchas de proteína es superior. De hecho, si se comparan los dos rangos de pH a esta misma concentración de proteína, no existen diferencias importantes entre el número de manchas resueltas, pero sí en la resolución de la separación, siendo mayor en el primero. Por lo anterior, para este órgano de la planta, el análisis de proteínas apoplásticas se debe realizar usando tiras de IPG en rango pH 5-8 para la primera separación por isoelectroenfoque. Estos resultados son similares a los obtenidos en otros estudios, en donde se han encontrado los mismos rangos de pH para la separación en la primera dimensión (18, 34).





**Figura 8.** Electroforesis en 2D para los extractos obtenidos mediante el procedimiento TCA/Acetona a partir de fluido apoplástico de tallos de clavel, con diferentes cantidades de proteína total y rango de pH en cada tira de isoelectroenfoque. **A.** 100 µg, pH 3-10, **B.** 200 µg, pH 3-10, **C.** 100 µg, pH 5-8, **D.** 200 µg, pH 5-8



**Figura 9.** Electroforesis en 2D para los extractos obtenidos mediante el procedimiento TCA/Acetona a partir de fluido apoplástico de raíces de clavel, con diferentes cantidades de proteína total y rango de pH en cada tira de isoelectroenfoque. **A.** 100 µg, pH 3-10, **B.** 200 µg, pH 3-10, **C.** 100 µg, pH 5-8, **D.** 200 µg, pH 5-8

**Tabla 4.** Condiciones de análisis para la separación en 2D de proteínas de fluido apoplástico de tallos y raíces de clavel variedad Golem

Tejido	Cantidad de proteína (μg)	Tiras IPG	No. spots*	Resolución**
Tallo	100	pI 3-10	119	Buena
		pI 5-8	117	Buena
	200	pI 3-10	193	Muy buena
		pI 5-8	182	Buena
Raíz	100	pI 3-10	57	Buena
		pI 5-8	86	Buena
	200	pI 3-10	107	Buena
		pI 5-8	98	Muy buena

\*Los valores encontrados de número de manchas son obtenidos mediante el programa PDQuest.

\*\*La resolución se determinó mediante inspección visual y evaluando el enfoque de una misma mancha proteica en los diferentes tratamientos evaluados.

Un análisis comparativo preliminar permite observar que algunas de las manchas proteicas se comparten en geles obtenidos a partir de fluido apoplástico de raíces y tallos de la planta, indicando que muchos de ellos deben contener proteínas que participan en procesos conservados en las células vegetales a nivel extracelular. Así mismo, se evidencian también manchas proteicas que son particulares de cada órgano, las cuales probablemente deben estar asociadas a otros procesos que se llevan a cabo de manera tejido-dependiente. Diferencias en la distribución de proteínas en función del órgano de la planta objeto de estudio han sido reportados en diferentes especies vegetales (38, 39).

## Conclusiones

Para la obtención de fluido apoplástico presente en tallos o raíces de clavel, se debe emplear la solución amortiguadora  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ - $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,1 M pH 6,5/ $\text{NaCl}$  50 mM/ $\beta$ -mercaptoetanol 0,1% v/v como solución de infiltración, ya que presenta buen rendimiento en la obtención de proteínas y la menor contaminación con proteínas intracelulares. Además, se pueden realizar dos centrifugaciones sobre el mismo material vegetal para obtener una mayor cantidad de fluido apoplástico, sin generar rompimiento de la membrana citoplasmática. En cuanto a la precipitación de proteínas, el método TCA/acetona presenta un rendimiento superior al 80% comparado con el método TCA/acetona/fenol, eliminando interferentes de tipo no proteico, presentes en la muestra. Para los análisis proteómicos en 2D (IEF-SDS-PAGE), se deben emplear 200 μg de proteína y tiras de IPG con pH 3-10 cuando las muestras proceden de fluido apoplástico de tallo, y 200 μg de proteína y tiras de IPG con pH 5-8 cuando proceden de fluido apoplástico de raíz. Este procedimiento puede ser aplicado a otras especies vegetales, con el fin de estudiar la dinámica del proteoma apoplástico en procesos biológicos que pueden incluir la interacción con patógenos.

## Agradecimientos

Los autores agradecen la financiación de la Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá (Proyecto DIB No. 201010023394), a Colciencias por la financiación del proyecto No. 110165842786 y al programa de apoyo a estudiantes de doctorado convocatoria 617. Especial agradecimiento a Florval S.A.S-Sede QFC por la donación del material vegetal empleado en estos estudios.

## Referencias

1. Delaunoy, B.; Jeandet, P.; Clément, C.; Baillieu, F.; Dorey S.; Cordelier, S. Uncovering plant-pathogen crosstalk through apoplasmic proteomic studies. *Front. Plant Sci.* **2014**, *5*, 249. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00249>.
2. Ge, Y.; Bi, Y.; Guest, D.I. Defense responses in leaves of resistant and susceptible melon (*Cucumis melo* L.) cultivars infected with *Colletotrichum lagenarium*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **2013**, *81*, 13–21. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2012.09.002>.
3. Floerl, S.; Druebert, C.; Majcherczyk, A.; Karlovsky, P.; Kues, U.; Polle, A. Defence reactions in the apoplasmic proteome of oilseed rape (*Brassica napus* var. *napus*) attenuate *Verticillium longisporum* growth but not disease symptoms. *BMC Plant Biol.* **2008**, *8*, 129. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2229-8-129>.
4. Floerl, S.; Majcherczyk, A.; Possienke, M.; Feussner, K.; Tappe, H.; Gatz, C.; et al. *Verticillium longisporum* Infection Affects the Leaf Apoplasmic Proteome, Metabolome, and Cell Wall Properties in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE*. **2012**, *7*, (2), e31435. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031435>.
5. Fernández, M. B.; Pagano, M.R.; Daleo, G.R.; Guevara, M.G. Hydrophobic proteins secreted into the apoplast may contribute to resistance against *Phytophthora infestans* in potato. *Plant Physiol. Biochem.* **2012**, *60*, 59–66. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.07.017>.
6. Goulet, C.; Goulet, M.C.; Michaud, D. 2-DE proteome maps for the leaf apoplast of *Nicotiana benthamiana*. *Proteomics*. **2010**, *10*, 2536–2544. DOI: <https://doi.org/10.1002/pmic.200900382>.
7. Olivieri, F.; Godoy, A.V.; Escande, A.; Casalongué, A.C. Analysis of intercellular washing fluids of potato tubers and detection of increased proteolytic activity upon fungal infection. *Physiol. Plant.* **1998**, *104*, 232–238. DOI: <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1998.10402118>.
8. Lohaus, G.; Pennewiss, K.; Sattelmacher, B.; Hussmann, M.; Hermann Muehling, K. Is the infiltration-centrifugation technique appropriate for the isolation of apoplasmic fluid? A critical evaluation with different plant species. *Physiol. Plant.* **2001**, *111*, 457–465.
9. Agrawal, G.K.; Jwa, N.S.; Lebrun, M.H.; Job, D.; Rakwal R. Plant secretome: unlocking secrets of the secreted proteins. *Proteomics*. **2010**, *10*, 799–827. DOI: <https://doi.org/10.1002/pmic.200900514>.
10. Wimmer, M.A.; Mühling, K.H.; Läuchli, A.; Brown, P.H.; Goldbach, H.E. The interaction between salinity and boron toxicity affects the subcellular distribution of ions and proteins in wheat leaves. *Plant Cell Environ.* **2003**, *26*, 1267–1274. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.0016-8025.2003.01051.x>.

11. Tasgin, E.; Atici, O.; Nalbantoglu, B.; Popova, L.P. Effects of salicylic acid and cold treatments on protein levels and on the activities of antioxidant enzymes in the apoplast of winter wheat leaves. *Phytochemistry*. **2006**, *67*, 710-715. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.01.022>
12. Mühling, K.H.; Läuchli, A. Interaction of NaCl and Cd stress on compartmentation pattern of cations, antioxidant enzymes and proteins in leaves of two wheat genotypes differing in salt tolerance. *Plant Soil*. **2003**, *253*, 219-231. DOI: <https://doi.org/10.1023/a:1024517919764>.
13. Alves, M.; Francisco, R.; Martins, I.; Ricardo, C.P.P. Analysis of *Lupinus albus* leaf apoplastic proteins in response to boron deficiency. *Plant Soil*. **2006**, *279*, 1-11. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11104-005-3154-y>.
14. Anand, A.; Lei, Z.; Sumner, L.W.; Mysore, K.S.; Arakane, Y.; Bockus, W.W.; *et al.* Apoplastic extracts from a transgenic wheat line exhibiting lesion-mimic phenotype have multiple pathogenesis-related proteins that are antifungal. *Mol. Plant Microbe Interact.* **2004**, *17*, 1306-1317. DOI: <https://doi.org/10.1094/MPMI.2004.17.12.1306>.
15. Witzel, K.; Shahzad, M.; Matros, A.; Mock, H.P.; Mühling, K.H. Comparative evaluation of extraction methods for apoplastic proteins from maize leaves. *Plant Methods*. **2011**, *7*, 48. DOI: <https://doi.org/10.1186/1746-4811-7-48>.
16. Ardila, H.D.; Fernández, R.G.; Higuera, B.L.; Redondo, I.; Martínez, S.T. Protein extraction and gel-based separation methods to analyze responses to pathogens in carnation (*Dianthus caryophyllus* L). In *Plant Proteomics: Methods and Protocols*; 2<sup>nd</sup> ed. Jorrin-Novo, J.; Komatsu, S.; Weckwerth, W.; Wienkoop, S. (Eds.); Humana Press: New York, 2014; pp 573-591. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-631-3\\_39](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-631-3_39).
17. Bodzon-Kulakowska, A.; Bierzynska-Krzysik, A.; Dylag, T.; Drabik, A.; Suder, P.; Noga, M.; *et al.* Methods for samples preparation in proteomic research. *J. Chromatogr. B*. **2007**, *849* (1-2), 1-31. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.10.040>.
18. Maldonado, A. M.; Echevarría-Zomeño, S.; Jean-Baptiste, S.; Hernández, M.; Jorrin-Novo, J. V. Evaluation of three different protocols of protein extraction for *Arabidopsis thaliana* leaf proteome analysis by two-dimensional electrophoresis. *J. Proteomics*. **2008**, *71* (4), 461-72. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.jprot.2008.06.012>.
19. Shaw, M. M.; Riederer, B. M. Sample preparation for two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics*. **2003**, *3*, (8), 1408-17. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/pmic.200300471>.
20. Delaunois, B.; Colby, T.; Belloy, N.; Conreux, A.; Harzen, A.; Baillic, F.; *et al.* Large-scale proteomic analysis of the grapevine leaf apoplastic fluid reveals mainly stress-related proteins and cell wall modifying enzymes. *BMC Plant Biol.* **2013**, *13*, 1-24. DOI: <http://doi.org/10.1186/1471-2229-13-24>.
21. Kim, S. G.; Wang, Y.; Lee, K. H.; Park, Z. Y.; Park, J.; Wu, J. *et al.* In-depth insight into in vivo apoplastic secretome of rice *Magnaporthe oryzae* interaction. *J. Proteomics*. **2013**, *78*, 58-71. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.10.029>
22. Higuera, B.L. Contribución al estudio de la participación de los compuestos fenólicos en los mecanismos de la interacción Clavel *Dianthus caryophyllus* L - *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. Tesis de doctorado, Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia, 2001.
23. Ramírez, E. Evaluación de los niveles de actividad y transcripcionales in vivo de algunas enzimas hidrolíticas secretadas por *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* en su interacción con el clavel *Dianthus caryophyllus* L. Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia, 2014.
24. Zhang, L.; Tian, L.H.; Zhao, J.F.; Song, Y.; Zhang, C.J.; Guo, Y. Identification of an apoplastic protein involved in the initial phase of salt stress response in rice root by two-dimensional electrophoresis. *Plant Physiol.* **2009**, *149* (2), 916-928. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.108.131144>.
25. Boller, T.; Kende, H. Hydrolytic enzymes in the central vacuole of plant cells. *Plant Physiol.* **1979**, *63* (6), 1123-1132. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.63.6.1123>.
26. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248-254. DOI: <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>.
27. Ramagli, L.S.; Rodríguez, L.V. Quantitation of microgram amounts of protein in two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis sample buffer. *Electrophoresis*. **1985**, *6* (11), 559-563. DOI: <https://doi.org/10.1002/elps.1150061109>.
28. Führs, H.; Götze, S.; Specht, A.; Erban, A.; Gallien, S.; Heintz, D.; *et al.* Characterization of leaf apoplastic peroxidases and metabolites in *Vigna unguiculata* in response to toxic manganese supply and silicon. *J. Exp. Bot.* **2009**, *60*, 1663-78. DOI: <https://doi.org/10.1093/jxb/erp034>.
29. Alexandersson, E.; Ali, A.; Resjö, S.; Andreasson, E. Plant secretome proteomics. *Front. Plant Sci.* **2013**, *4* (9). DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00009>
30. Song, Y.; Zhang, C.; Ge, W.; Zhang, Y.; Burlingame, A. L.; Guo, Y. Identification of NaCl stress-responsive apoplastic proteins in rice shoot stems by 2D-DIGE. *J. Proteomics*. **2011**, *74*, 1045-1067. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.03.009>.
31. Buyel, J. F.; Twyman, R. M.; Fischer, R. Extraction and downstream processing of plant-derived recombinant proteins. *Biotechnol. Adv.* **2015**, *33*, 902-913. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.04.010>.
32. Hancock, R. E. W.; Carey, A. M. Outer Membrane of *Pseudomonas aeruginosa*: heat-2-mercaptoethanol-modifiable proteins. *J. Bacteriol.* **1979**, *140* (3), 902-910.
33. Valero Galván, J.; Valledor, L.; Navarro Cerrillo, R. M.; Gil Pelegrín, E.; Jorrin-Novo, J. V. Studies of variability in Holm oak (*Quercus ilex* subsp. *ballota* [Desf.] Samp.) through acorn protein profile analysis. *J. Proteomics*. **2011**, *74* (8), 1244-55. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.05.003>.
34. Curto, M.; Camafeita, L. E.; López, J. A.; Maldonado, A. M.; Rubiales, D.; Jorrin, J. V. A proteomic approach to study pea (*Pisum sativum*) responses to powdery mildew (*Erysiphe pisi*). *Proteomics*. **2006**, *6* (S1), 163-74. DOI: <https://doi.org/10.1002/pmic.200500396>.
35. Castillejo, M.A.; Amiour, N.; Dumas-Gaudot, E.; Rubiales, D.; Jorrin, J. V. A proteome approach to studying plant response to crenate broomrape (*Orobancha crenata*) in pea (*Pisum sativum*). *Phytochemistry*. **2004**, *65* (12), 1817-1828. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2004.03.029>.

36. Jellouli, N.; Salem, A. B.; Ghorbel, A.; Jouira, H. B. Evaluation of Protein Extraction Methods for *Vitis vinifera* Leaf and Root Proteome Analysis by Two-Dimensional Electrophoresis. *J. Integr. Plant Biol.* **2010**, 52 (10), 933–940. DOI: <http://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2010.00973.x>.
37. Carpentier, S. C.; Witters, E.; Laukens, K.; Deckers, P. Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: An evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis. *Proteomics*. **2005**, 5, 2497–2507. DOI: <http://doi.org/10.1002/pmic.200401222>
38. Kieffer, P.; Schröder, P.; Dommesb, J.; Hoffmann, L.; Renaut, J.; Hausman, J. F. Proteomic and enzymatic response of poplar to cadmium stress. *J. proteomics*. **2009**, 72, 379-396. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.jprot.2009.01.014>
39. Baerenfaller, K.; Grossmann, J.; Grobe, M. A.; Hull, R.; Hirsch-hoffmann, M.; Yalovsky, S.; *et al.* Genome-Scale Proteomics Reveals. *Science* **2008**, 320, 938–941. DOI: <http://doi.org/10.1126/science.1157956>

**Article citation:**

Martínez, A. P.; Martínez, S. T; Ardila, H. D. Condiciones para el análisis electroforético de proteínas apoplásticas de tallos y raíces de clavel (*Dianthus caryophyllus* L) para estudios proteómicos *Rev. Colomb. Quim.* **2017**, 46 (2), 5-16. DOI: <http://dx.doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v46n2.62958>